

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学号：200126011

UDC _____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文
产氢微生物菌种筛选及
产氢条件优化

Screens of H₂-Production Strains and
Optimization of H₂-Production Conditions

傅雅婕

指导教师姓名：魏文铃教授

龙敏南副教授

专 业 名 称：微生物学

论文提交日期：2004 年 6 月

论文答辩时间：2004 年 6 月

学位授予日期：

答辩委员会主席：张凤章教授

评 阅 人：张凤章教授

叶德赞研究员

2004 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的
研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体
的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有
和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要	7
英文摘要	8
1 前言	9
1.1 氢能概述	9
1.2 制氢方法	10
1.3 生物制氢	12
1.4 本论文研究内容与目的	19
2 材料与方法	21
2.1 菌株	21
2.2 主要培养基及生化试剂	21
2.3 主要仪器	23
2.4 菌种筛选与产氢测定	24
2.5 菌种鉴定	24
2.6 生长温度的测定	26
2.7 生长曲线和产物的测定	26
2.8 产氢稳定性的考察	27
2.9 反硝化实验	27
2.10 硝酸盐实验	27
3 结果与分析	28
3.1 菌种筛选与鉴定	28
3.1.1 菌种筛选	28
3.1.2 菌种鉴定	30
3.2 克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella</i> sp.) FX12 的生物学特性	33
3.2.1 菌体生长温度的测定	33
3.2.2 菌体生长、产氢、耗氧和糖代谢情况	35
3.3 影响克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella</i> sp.) FX12 产氢总量的因素	37
3.3.1 初始 pH 对克雷伯氏菌 FX12 产氢总量的影响	37
3.3.2 初始葡萄糖浓度对克雷伯氏菌 FX12 产氢总量的影响	38
3.3.3 温度对克雷伯氏菌 FX12 产氢总量的影响	40

3.3.4 碳源对克雷伯氏菌 FX12 产氢总量的影响.....	42
3.3.5 气相氧浓度对克雷伯氏菌 FX12 产氢总量的影响.....	43
3.3.6 菌体密度对克雷伯氏菌 FX12 产氢总量的影响.....	45
3.4 正交实验结果.....	46
3.5 克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella</i> sp.) FX12 产氢稳定性的考察.....	50
3.6 克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella</i> sp.) FX12 代谢途径的初步探讨—— 硝酸盐系列实验.....	51
3.6.1 反硝化实验.....	51
3.6.2 硝酸盐对克雷伯氏菌 FX12 产氢的影响.....	51
3.6.3 硝酸盐实验.....	52
4 结论与讨论.....	54
4.1 菌种的筛选与鉴定.....	54
4.2 克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella</i> sp.) FX12 生物学特性.....	55
4.3 影响克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella</i> sp.) FX12 产氢总量的因素.....	55
4.4 克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella</i> sp.) FX12 产氢条件优化.....	58
4.5 硝酸盐系列实验	59
5 图版.....	61
6 参考文献.....	62
7 致谢.....	69

Catalogue

Abstract	8
1 Introduction.....	9
1.1 Hydrogen energy description.....	9
1.2 Hydrogen production technologies.....	10
1.3 Biohydrogen production.....	12
1.4 Content and purpose of the research.....	19
2 Materials and methods.....	21
2.1 Strains.....	21
2.2 Main mediums and biochemical reagents.....	21
2.3 Main instruments.....	23
2.4 Screen of strains and menstruation of the quality of H ₂ -production.....	24
2.5 Identification of strain.....	24
2.6 Menstruation of growth-tempturature.....	26
2.7 Experiments of growth,H ₂ -production,O ₂ -consumption and metabolism of glucose.....	26
2.8 Menstruation stability.....	27
2.9 Denitrification experiment.....	27
2.10 Nitrate experiment.....	27
3 Results and analysis.....	28
3.1 Screen and identification of strains.....	28
3.1.1 Screen of strains.....	28
3.1.2 Identification of strain.....	30
3.2 Biological characters of <i>Klebsiella</i> sp. FX12.....	33
3.2.1 Growth-temperature experiment	33
3.2.2 Relations of growth, H ₂ -production,O ₂ -consumption and metabolism of glucose.....	35
3.3 Effects of factors on the H ₂ -production of <i>Klebsiella</i> sp.FX12.....	37
3.3.1 Effects of starting pH on the H ₂ -production of <i>Klebsiella</i> sp. FX12.....	37

3.3.2 Effects of starting-concentration of glucose on the H ₂ -production of <i>Klebsiella</i> sp. FX12.....	38
3.3.3 Effects of temperature on the H ₂ -production of <i>Klebsiella</i> sp. FX12.....	40
3.3.4 Effects of carbon sources on the H ₂ -production of <i>Klebsiella</i> sp. FX12.....	42
3.3.5 Effects of O ₂ -content on the H ₂ -production of <i>Klebsiella</i> sp. FX12.....	43
3.3.6 Effects of cell density on the H ₂ -production of <i>Klebsiella</i> sp. FX12.....	45
3.4 Results of Orthogonal test.....	46
3.5 Studies on H ₂ -production stability of <i>Klebsiella</i> sp. FX12.....	50
3.6 Studies of metabolism of <i>Klebsiella</i> sp. FX12——experiments about nitrate.....	51
3.6.1 Denitrification.....	51
3.6.2 Effects of nitrate on the H ₂ -production of <i>Klebsiella</i> sp. FX12.....	51
3.6.3 Nitrate experiment.....	52
4 Conclusions and discussions.....	54
4.1 Screen and identification of strains.....	54
4.2 Biological characters of <i>Klebsiella</i> sp. FX12.....	55
4.3 Effects of single factor of <i>Klebsiella</i> sp. FX12.....	55
4.4 Optimization of H ₂ -production conditions.....	58
4.5 Series of nitrate experiments.....	59
5 Figures.....	61
6 References.....	62
7 Thanks.....	69

摘 要

氢气因其具有清洁无污染、燃烧热值高、易于储存和运输等诸多优点而被认为是一种极具潜力的未来能源，国内外众多科技人员纷纷对其开展研究工作。本研究从糖厂废弃物中筛选获得一株高效产氢菌株，考察了影响该菌株产氢总量的各种因素，例如 pH、葡萄糖浓度、温度、碳源、气相氧浓度和菌体密度等。在此基础上用正交设计实验进行产氢条件优化，以期获得菌株单位体积培养液中最大产氢总量。

对采集的 7 个样品进行初筛和复筛，获得产氢总量较高的菌株 FX12(30 h 内产氢量 0.560 L/L)。采用细菌鉴定仪和 16S rRNA 测定等方法对菌株 FX12 进行鉴定，该菌株被命名为克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp.) FX12。

影响克雷伯氏菌 FX12 产氢总量因素的研究结果表明，在微氧条件（小于 0.025 L/L）下以葡萄糖为碳源可以提高该菌株的产氢总量。产氢过程中适宜葡萄糖浓度为 0.15 ~ 0.2 mol/L，适宜初始 pH 值为 7.2 ~ 8.7，适宜菌体密度 OD₆₁₀ 值为 0.91，适宜温度范围为 26 ~ 39 。

通过对影响克雷伯氏菌 FX12 产氢总量主要因素的正交实验，确定了该菌株产氢的最优条件为：葡萄糖浓度 0.2 mol/L，pH7.7，OD₆₁₀ 值为 1.00，温度 35 下微氧培养；综合实验结果表明，克雷伯氏菌属 (*Klebsiella* sp.) FX12 在 28 h 内产氢量为 2.784 L/L，比复筛时该菌株的产氢量增长了 399%。

克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp.) FX12 连续传接 20 代以后，产氢总量为 2.529 L/L，比原代的产氢总量降低了 0.255 L/L，显示出该菌株具有较好的产氢稳定性能。

此外，本研究还对该菌株的生物学特性和代谢途径进行了初步探讨。

关键词：菌株筛选；克雷伯氏菌 FX12；产氢条件

Abstract

Hydrogen energy has been considered as one of the most potential future energy for it is pollution-free, high heat value and may be stored and transported rather easily. In this research, we have screened a high-efficient hydrogen producing strains from the waste of sugar-refinery, and figured out some common rules influence the activity of hydrogenase and the H₂-production yield (e.g. pH, carbon sources, glucose concentration, temperature, O₂ proportion and cell density). Further more, we have optimized the conditions according to the results of orthogonal test and thus we could find out the largest H₂-production yield per liter.

Klebsiella sp. FX12 has been confirmed to be the target strain as it has reached the H₂-production yield of 0.560 L/L by screening and secondly screening among seven samples collected from the sugar-refinery. Also it's been identified as *Klebsiella* sp. by BBL Crystal™ and 16S rRNA sequencing results.

The results of single-factor test of *Klebsiella* sp. FX12 suggests that the yield can be improved under the condition of low O₂ concentration (<0.025 v/v) using the glucose as carbon source. The suitable conditions are as follows: the initial pH value is 7.2 ~ 8.7, the glucose concentration is 0.15~0.2 mol/L, the cell density (OD₆₁₀) is 0.91 and the temperature range is around 26~39 .

Using orthogonal test optimizes the conditions above, and finally it indicates that the ideal H₂-producing conditions should be: glucose concentration is 0.2 mol/L, pH is 7.7, OD₆₁₀ is 1.00, the temperature is 35 (in low O₂ concentration). Thus the yield in 28 hours is 2.784 L/L, nearly 4 times more than that of the original strain.

And it shows better stability of *Klebsiella* sp. FX12 for the yield merely decrease 0.255 L/L after 20 times transfer of cultures.

Besides, the biological characters and metabolism of *Klebsiella* sp. FX12 have been simply studied.

Keywords: screen of strains; *Klebsiella* sp. FX12; conditions of H₂-production

1. 前言

1.1 氢能概述

氢能是一种二次能源。氢燃料和其他碳氢燃料在性能上有显著差别，氢作为燃料有独特的优点。氢和部分碳氢燃料的性质比较见表 1。

表 1 氢、甲烷和汽油的若干性能比较^[1]

性质	氢	甲烷	汽油
一个大气压和			
300K 下的密度 (kg/m^3)	0.082	0.717	5.11
燃烧热: HHV (MJ/kg)	141.7	52.68	48.29
LHV (MJ/kg)	119.7	46.72	44.79
300K 时的运动粘度 (mm^2/s)	110	17.2	1.18
300K 时的导热系数 (mW/mK)	182.0	34.0	11.2
在空气中的扩散系数 (cm^2/s)	0.61	0.189	0.05
着火极限 (容积%)	4—75	5.3—15.0	1.2—6.0
最小点火能量 (mJ)	0.02	0.28	0.25
绝热火焰温度 (K)	2318	2190	~2470
自燃温度 (K)	858	813	~500—750

从表 1 中可以看出，与其他燃料相比，氢具有很大的优势。与其他已知燃料相比，氢的单位质量燃烧热值最高，同等重量下燃烧反应所放出的能量是甲烷与汽油的 3 倍，煤的 7 倍。由于氢的运动粘度、扩散系数和导热系数都较其他燃料高出许多，并且密度又很小，所以氢具有易于扩散和进行热传播的性质，同时也便于储存和运输。

氢燃烧后的残余能量很少，能量基本都被释放出来。与其它燃料相比，没有碳氢化合物、一氧化碳和二氧化碳等污染物。虽然氢在空气中燃烧会像其他燃料一样产生氮氧化物，但要比石油基燃料低 80%^[2]。

氢的独特性质还在于它的化学简单性。氢在发生反应时，破坏和形成的键相对较少，具有高的反应速率常数，能量释放非常快，燃烧的持续时间非常短，因此具有很高的输出效率。

正是因为氢具有以上诸多优点，早在 20 世纪 70 年代就被人们誉为“未来的燃料”。

以化石能源为主的能源体系，由于污染环境、不能再生并且即将耗尽，最终将被其他能源所取代。氢能是一种极具潜力的未来能源，这一点已经成为世界上许多国家的共识。人们早就开展了与氢能发展相关的研究项目^[3-8]，例如北欧国家如冰岛、丹麦等已在筹划建立国家氢能系统^[9-10]。在日本，由能源部主导的 WE-NET(World Energy Network)计划于 1993 年正式启动，目标是在 20 年内建立一个世界范围的能源网络，以实现可再生能源——氢能的有效生产、运输和利用^[11]。我国已经开始“氢能的规模制备、储运及相关燃料电池的基础研究”(即氢能“973”项目)，正在进行“十五”氢能项目和“863”燃料电池汽车等重大研究专项。

要实现氢能的实际应用，首先需要解决的就是当前所采用的制氢技术中成本过高的问题。

1.2 制氢方法

当前发展成熟的制氢技术有化石能源制氢和电解水制氢。而具有发展潜力的制氢方法包括热化学制氢，光电制氢、光电化学制氢和生

物制氢^[6]。其中生物制氢被认为是最具有发展潜力的制氢方法之一。

1.2.1 常规制氢方法

煤气化：煤在高温高压下与气化剂转化成气体产物。气体产物中含有氢气等组分，氢气占所产生气体总体积的 30 ~ 39 %。

天然气 / 烃类物质的氧化重整：该法是在催化剂存在下与水蒸气反应制得氢气。此法需要外部供热，热效率较低。反应过程中水消耗量大，并且能耗较高。

重油部分氧化：重油原料包括有常压、减压渣油及石油深度加工后的燃料油，部分重油燃烧提供转化吸热反应所需热量及一定的反应温度。重油与水蒸气及氧气反应制得含氢的气体产物，气体产物中氢气体积占 46 %，纯度不高。

化石燃料制氢工艺发展成熟，但因为化石能源具有不可再生性，长期前景不容乐观。

电解水制氢：电解水制氢是氢与氧燃烧反应生成水的逆过程。提供电能使水分解制得氢气的效率一般为 75 ~ 85 %，制得的氢气纯度较高，工艺过程简单并且无污染，但是消耗电量较大，浪费能源，因此应用受到一定的限制。近年来水电解的工艺、设备不断改进，如使用固体高分子离子交换膜作为电解质，替换原来使用的强碱性电解液；在电解工艺上采用高温高压参数以利于反应进行等，但是水电解制氢的能耗仍然较高，一般每立方米氢气电耗为 4.5 ~ 5.5 kWh 左右。

1.2.2 制氢新工艺

以水为原料的热化学循环分解水制氢方法，避免了水直接热分解所需要的高温（4000 以上），并且可以减低电耗，受到人们的重视。该方法是在水反应系统中加入一个中间物，通过不同的反应阶段，最

终将水分解为氢和氧，各阶段反应温度均较低。

光电制氢又被称为太阳能氢能系统，国外已开展了实验性研究。当前需要解决的是太阳电池转换能量效率不高和成本昂贵的问题。

光电化学制氢是以水为原料，光催化分解制取氢气的方法。光催化过程是指在光照下通过含有催化剂的反应体系促进水解制得氢气的过程。该方法还处于基础研究阶段，具有开发前景^[6]。

1.3 生物制氢

生物制氢即微生物制氢，可分为光合制氢和发酵制氢两种类型。在 50 年前 ,Gaffron et.al^[7]发现了真核单细胞绿藻 *Scenedesmus obliquus* 在厌氧和光照条件下能够通过氢酶产氢，这被称为光合制氢。在 1971 年 ,Nakos 和 Mortenson 从巴氏芽孢梭菌中获得纯化的氢酶并称之为铁硫蛋白^[12]，它可以催化氢的产生或消耗，从此开始了发酵制氢的研究工作。

生物制氢与传统的物理化学制氢方法相比，具有不消耗矿物资源和制氢成本低廉的突出优点，符合可持续发展战略，已经引起广泛的重视，必将成为未来发展的方向。

1.3.1 产氢的生物种类及其产氢性能比较

1.3.1.1 产氢生物种类

已报道的产氢生物主要有以下四类^[13-36]：

绿藻 (*Chlorophyceae*)：栅藻属 (*Scenedesmus*)、衣藻属 (*Chlamydomonas*)等。

蓝细菌(*Cyanobacteria*)：鱼腥蓝细菌属(*Anabaena*)、念珠蓝细菌属(*Nostoc*)、拟惠氏蓝细菌属(*Westiellopsis*)、聚球蓝细菌属(*Synechococcus*)、颤蓝细菌属(*Oscillatoria*)、集胞蓝细菌属

(*Synechocystis*)、隐杆蓝细菌属(*Aphanothece*)、鞭枝蓝细菌属(*Mastidocladus*)和席蓝细菌属(*Phormidium*)等。

光合细菌：红假单胞菌属(*Rhodobater*)、红螺菌属(*Rhodospirillum*)、着色菌属(*Chromatium*)、绿菌属(*Chlorobium*)、荚硫菌属(*Thiocapsa*)和盐杆菌属(*Halobacterium*)等。

厌氧和兼性厌氧细菌：肠杆菌属(*Enterobacter*)、梭菌属(*Clostridium*)、脱硫弧菌属(*Desulfopibrio*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、乳杆菌属(*Magashaera*)和埃希氏菌属(*Escherichia*)等。

1.3.1.2 产氢生物的产氢性能

表 2 不同微生物产氢效率比较^[37]

生物类群	代表种属	培养基	最大产氢速率 (mmol H ₂ /g·dry-cell·h)
蓝细菌			
	<i>Oscillatoria</i> sp.Niami BG7	培养基 A 除去 NH ₄ Cl	0.3
	<i>Anabaena</i> CA	ASP-2	2.14
光合细菌			
	<i>Rhodopseudomonas capsulate</i>	乳酸盐和其它氮源	5.3
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	糖精废水	1.2
	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	有机物	2.5
厌氧/兼性厌氧细菌			
	<i>Clostridium butyricum</i>	培养基中含有葡萄糖	7.3
	<i>Citrobacter intermedius</i>	纤维素、淀粉、葡萄糖	9.5
	<i>Enterobacter cloacae</i> IIT BT-08	培养基中含有蔗糖	29.63

由表 2 可以看出,厌氧/兼性厌氧细菌产氢的效率总是比其他产氢生物的产氢效率更高。

1.3.1.3 不同生物产氢的性能评述

蓝细菌产氢的优点是能以水作为氢供体产氢,固氮酶和氢酶都能产生氢气,并能从大气中固定氮气;缺点是产生的气体中含有 30% 的氧气,需要太阳光照,吸氢酶具有很高的活性因此会影响氢气的产生和积累。

真核生物,如绿藻/红藻/褐藻产氢的优点是能利用太阳能光解水产生氢气,转化太阳能的能力是绿色植物的 10 倍;缺点是产氢需要光照,氢酶对氧气很敏感,培养过程中需要厌氧的适应时期,氢产率较低。

光合细菌产氢的优点是放氢量大,能利用各种有机废水产氢,可用于废水处理中,不产生氧气;缺点是培养条件较为苛刻,厌氧发酵的过程中会产生难闻气味,产生的气体中混杂有二氧化碳,需要光照培养。

厌氧/兼性厌氧细菌产氢的优点是没有光照的限制,能长时间连续产氢,能够利用各种碳源产氢,可用于废弃物处理,产氢的过程中能产生各种有用的有机物,如丁酸、乙酸和乳酸等,细菌生长速度快,对工业化生产有利;缺点是产生的气体中混杂有二氧化碳,厌氧发酵的过程中会产生难闻气味。

1.3.1.4 发酵制氢的主要方式

当前发酵制氢研究主要有以下两种方式:

(1) 利用厌氧/兼性厌氧细菌、光合细菌单独或混合制氢

厌氧/兼性厌氧细菌或者是光合细菌利用有机废水/废弃物制氢已成为当前研究的重点^[38,39,41,42]。因为这既能减少对环境的污染,又能

产生能源,并且降低生产成本,是一种经济合理的运行方式。Jiunn-jyi 等^[38]利用城市有机固体废物(OFMSW)制取氢气,获得的产氢率为 45mL g VSS⁻¹·h⁻¹,氢在产生的气体中的比例超过 60%。

另一种方式是使用光合细菌与厌氧/兼性厌氧发酵细菌的混合系统制氢。在混合系统中,发酵细菌通过降解各种碳氢化合物生长并产生氢气。它产生的有机酸可以作为光合细菌产氢的原料。混合这两种细菌不但能减少光合细菌对光能的需求,而且还能增加氢的产量。Gyoo Yeol Jung 等^[39]将 *Citrobacter* sp.Y19 与 *Rhodopseudomonas palustris* P4 混合培养,得到的最大氢产率为 27.1mmol H₂/(g·cell·h),是单独培养 *Rhodospirillum rubrum* 产氢量的 3 倍。

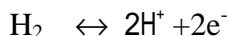
(2) 活性污泥厌氧发酵制氢

任南琪等运用活性污泥进行厌氧发酵制氢,以非固定化的混合菌种(厌氧活性污泥)作为氢气生产者,取代了传统的细胞固定化技术,采用连续流运行,在处理高浓度的有机废水的同时回收大量的氢与甲烷,其中试研究成果达到了世界先进水平^[40]。

综上所述,发酵制氢比光合制氢效果好,其中又因为光合细菌培养条件苛刻,培养时间长,产氢速度慢;厌氧/兼性厌氧细菌易于培养并且产氢效率高,所以厌氧/兼性厌氧细菌更适合工业化生产的需要。考虑到运用厌氧/兼性厌氧细菌处理有机废水会产生难闻的气味,可以考虑把制氢作为废水处理的一个前期步骤。例如 Heguang.Z^[41]使用 *Rhodobacter sphaeroides* 降解豆腐废水产生氢气。经过产氢处理后的废水再使用传统的物理化学方法进行吸收、浓缩和氧化处理,取得了良好的经济效益。

1.3.2 厌氧/兼性厌氧细菌的氢酶与氢代谢

氢酶是一类在生物体内催化氢的产生或消耗的酶，是氢代谢途径中的关键酶，反应式为：



在厌氧代谢过程中，氢酶有可能是维持氧化还原平衡的一种重要的调节体系。氢酶的作用在于，沟通电子从还原态电子载体沿着氢酶传递到质子（ H^+ ），最终把 H^+ 还原，产生 H_2 。质子就是氢酶的末端电子受体。兼性厌氧细菌和严格厌氧细菌在厌氧条件下的产氢机制是一样的，此时能量均来源于底物水平磷酸化。因而在代谢过程中易形成过剩的还原态电子载体，它们依靠氢酶作用，将其还原态变成氧化态电子载体，并产生氢，以此保证电子载体的循环和不断提供 ATP，因此氢代谢与能量代谢是密切联系的。

在氢代谢途径中，氢酶会和许多其他酶系组成氢酶体系共同发生作用。例如：甲酸盐-氢酶-裂合酶、乙酸脱氢酶氢酶、NAD 还原氢酶、NADP 还原氢酶、葡萄糖脱氢酶氢酶^[43]、铁氧化还原蛋白氧化氢酶和大量的膜结合态细胞色素还原氢酶^[44,45]等。氢酶具有多种不同的电子供体和电子受体。

氢酶主要存在于一些原核生物和低等的真核生物体中。目前已经发现在许多不同微生物类群中存在氢酶，包括：专性厌氧细菌（如巴氏芽孢梭菌），兼性厌氧细菌（如大肠杆菌），好气氢细菌（如诺卡氏菌），固氮菌（包括根瘤菌），蓝细菌（如柱孢鱼腥藻），光合细菌，以及某些真核生物（如绿藻、绿色植物和原生动物）等。

1.3.2.1 氢酶的类型

根据氢酶的催化性质可分为吸氢酶和放氢酶。吸氢酶催化氢的氧化，放氢酶催化质子的还原。实际上，每一个氢酶都是既催化吸氢，

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库